

机械伤害刺激激活丘脑-皮层神经网络的多通道记录研究^{*}

王锦琰 罗 非

(中科院心理研究所心理健康重点实验室, 北京 100101)

摘要 目的: 在清醒大鼠脑内同步记录内、外侧痛觉传导通路神经元的伤害性活动, 在丘脑-皮层水平观察各脑区的编码模式以及脑区之间的功能联系。方法: 麻醉状态下在动物丘脑和皮层的四个区域单侧植入微电极阵列, 在清醒状态下给予伤害和非伤害性机械刺激, 同步记录多个神经元的单位电活动, 并利用滑行窗口分析、交互相关分析、聚类分析以及判别分析等运算方法进行信息提取。结果: 在 7 只大鼠上共记录到 180 个神经元的单位电活动。伤害和非伤害机械刺激均引起以兴奋为主的反应。与非伤害刺激相比, 伤害性刺激使各脑区神经元反应比例显著增加, 平均反应强度显著增加, 两条通路上脑区之间的相关性亦显著增加。另外, 从神经元群体编码的角度看, 内侧通路对伤害与非伤害机械刺激的分辨能力稍优于外侧通路。结论: 中枢对伤害性机械刺激的编码有赖于多个脑区的共同参与, 内、外侧系统对刺激的编码能力不同, 可能与刺激本身的特性有关。

关键词 皮层; 丘脑; 疼痛; 大鼠; 多通道记录

THE ACTIVATION OF THALAMO-CORTICAL NEURAL NETWORK BY NOXIOUS MECHANICAL STIMULATION: A MULTICHANNEL RECORDING STUDY

WANG Jin-Yan, LUO Fei

(Key Laboratory of Mental Health, Institute of Psychology, Chinese Academy of Science, Beijing 100101)

Abstract Objective To simultaneously record the nociceptive neuronal activity within medial and lateral pain pathways in awake rats and explore the nociceptive coding patterns and functional connections at thalamo-cortical level. Methods Rats were anesthetized and mounted on a stereotaxic apparatus. Four microarrays were implanted unilaterally into the target thalamic and cortical areas. Simultaneous recording of thalamo-cortical single neurons was obtained in the awake state during the delivery of noxious or innocuous stimuli. Analysis methods involved sliding-window technique, cross-correlation computation, cluster analysis and discriminant analysis. Results A total of 180 single neurons were detected in seven rats. Both noxious and innocuous mechanical stimuli induced predominantly excitatory responses within recorded areas. The painful stimuli gave rise to higher response intensity, larger percentage of responding neurons, and stronger inter-regional cross-correlations compared to nonpainful stimuli. Furthermore, by comparison of neural ensemble performance discriminating painful from nonpainful mechanical stimuli, it seemed that the discrimination capability of medial system was somehow better than lateral system. Conclusion The central nervous encoding of nociception depends on the extensive activation of multiple brain regions. The discrimination capability of medial versus lateral system was different, which may be related to the property of stimulation *per se*.

Key words Cortex, Thalamus, Pain, Rat, Multichannel recording

^{*} 本工作由国家自然科学基金 (30170307, 30370461, 30570577)、中国科学院百人计划、教育部新世纪优秀人才支持计划 (985-2-068-113)、教育部 211 工程项目、科技部 973 项目 (2003CB515407) 资助课题

痛觉信息从脊髓经脊丘束到丘脑的上传通路早在 19 世纪后半叶就已证实, 丘脑曾经被认为是痛觉信息处理的最高级中枢^[1]。近年来, 随着研究手段的不断进步, 对于丘脑各组分的功能以及丘脑与皮层的联系有了更深入的了解。丘脑的内、外侧结构在痛觉加工中的作用是不同的, 内侧丘脑与情绪、动机有关, 而外侧丘脑则与感觉辨别有关^[2]。内、外侧丘脑分别将伤害性信息传递至皮层的不同部位, 形成了两条平行的、分离的痛觉传导通路, 分别称为内、外侧痛觉通路。电生理和功能影像学都证实, 体内确实存在一个负责处理伤害性信息的系统, 它既包含传入又包含传出, 既包含感觉分析, 又包含运动反应、情绪活动和认知过程, 是一个复杂的神经网络^[4]。本实验以大鼠作为研究对象, 探讨了内、外侧痛觉传导通路上一些代表性脑区的伤害性活动, 以期获得关于疼痛网络编码的一些初步信息。

材料与方法

1 实验动物

选用成年健康雄性 Sprague-Dawley 大鼠 ($n=7$)。初始体重为 200~250 g 单笼饲养, 自由进食和饮水, 保持 12 hr: 12 hr 的人工昼夜节律, 以 7:00 am 为暗周期的开始。适应环境至少一周, 体重达 300~350 g 后进行电极埋置手术。

2 实验药品及器材

盐酸氯胺酮注射液, 手术麻醉用, 腹腔注射, 100 mg/kg 双臂立体定位仪 (Model 962), 美国 David Kopf 精密仪器公司; 体视显微镜 (SMZ-140), 北京麦克奥迪仪器仪表有限公司; 示波器 (POS902Q 20 MHz), 澳门光电仪器有限公司; 多通道记录系统, 美国 Biographics (Winston-Salem, NC) 公司生产提供, 包括微电极阵列 (每个微电极阵列由 8 根电极丝组成, 排列成 2 4 或 3 3 2 的矩阵)、实验操作箱 (44 × 44 × 44 cm³)、连接器、前置放大器和换向器; 机械测痛笔, 北京航空航天大学机电设备研究所。

3 电极植入

动物用氯胺酮麻醉后, 固定于立体定位仪, 依据大鼠脑图谱^[5]定位感兴趣的脑区: 初级躯体感觉皮层 (the primary somatosensory cortex SI) 定位于 bregma 后 1.0 mm (-1.0A), 中线旁开 2.0 mm (L), 深距颅骨表面 2.0 mm (V); 前扣带皮层 (the anterior cingulate cortex, ACC), 3.2A, 0.8L, 2.5V; 丘脑腹后外侧核 (ventral posterior lateral nucleus of

thalamus VPL), -3.0A, 3.0L, 6.0V; 丘脑束旁核 (parafascicular nucleus Pf), -4.2A, 1.3L, 6.0V。利用立体定位仪将微电极阵列缓慢推进至靶脑区。单侧植入, 左侧 $n=4$ 右侧 $n=3$ 。

4 疼痛刺激

将清醒动物束缚于塑胶支架上, 采用特制的机械测痛笔, 尖端直径 1.5 mm, 另一端作用于一弹簧, 弹簧所受的力通过压力刻度表显示。当笔的尖端压迫大鼠足背皮肤时, 刻度表指针即可显示所施加的压力。痛刺激强度设定为 80~100 g 刺激持续时间为 700 ms 刺激部位为对侧足背皮肤。为避免组织损伤, 连续两次刺激部位相距 5 mm 以上。对照刺激为 5~10 g 其它条件不变的触觉刺激。痛、触觉刺激随机掺杂给予, 各 80 次左右。

5 统计学分析

(1) 利用环事件直方图 (PSTH) 评价神经元的兴奋或抑制反应。(2) 利用滑行窗口计算方法评价神经元是否产生了兴奋或抑制。具体说, 将一定宽度的时间窗口沿时间轴方向以一定步长滑行, 每滑过一步, 计算该窗口内的平均放电频率, 将这些频率值与预先设置的对照窗口 (通常为一段基线的平均值) 进行配对 t 检验, 以连续 3 个窗口出现 $P < 0.005$ 作为评价显著性反应的标准, 使总体显著性达到 $P < 0.05$ 。(3) 将滑行窗口计算所得到的 P 值转换为 $-ln P$, 用于评价放电强度。(4) 交互相关分析, 通过计算一个神经元相对于另一个神经元的放电频率来考察两个神经元在时间上是否具有同步性活动。(5) 聚类分析, 是将神经元按照其反应模式归类, 以分析不同脑区神经元放电反应的时间模式。(6) 线性判别分析, 通过建立判别函数来检测判别正确率, 若高于随机判别率则说明神经元群的活动中包含有关不同事件之间差别的特定信息。(7) χ^2 检验, 用于比较反应比例的差异。

6 组织学定位

实验结束后, 腹腔注射 10% 水合氯醛深麻大鼠, 给电极通以阳极直流电 (强度 10~20 μ A, 持续 10~20 s 使电极尖端涌出铁离子)。4% 多聚甲醛灌流后取脑组织, 进行冰冻切片 (50 μ m), 取记录脑区的切片置于 5% 亚铁氰化钾和 2% 盐酸的等量混合液中孵育, 电极尖端所在位置被标记为蓝点 (铁离子与亚铁氰根结合后形成蓝色的亚铁氰化铁)。根据大鼠脑图谱^[5]确认蓝点是否位于所要研究的脑区, 根据定位结果对所记录数据进行取舍。

结 果

同步记录到 180个神经元的单位电活动, 其中 42个来自 SI 42个来自 ACC, 49个来自 VPL, 47个来自 Pf 两种不同强度的机械刺激使各个脑区的

神经元发生放电频率的改变, 表现为兴奋和抑制, 如表 1所示。总的来说, 各脑区的神经元反应以兴奋为主。与非痛刺激相比, 痛刺激使各个脑区反应神经元的比例明显增高。

表 1 伤害性刺激和非伤害刺激引起的神经元反应比例比较

Table 1 Percentage of responding neurons induced by painful or control stimuli

脑区 brain areas	对照刺激 control			伤害性刺激 pain		
	E	I	total	E	I	total
ACC	19	3	22 (52. 4%)	33	3	36 (85. 7%) **
Pf	18	4	22 (46. 8%)	34	3	37 (78. 7%) **
SI	22	2	24 (57. 1%)	33	2	35 (83. 3%) *
VPL	21	3	24 (49. 0%)	33	4	37 (75. 5%) *

*, **: 与对照刺激引起的反应相比, $P < 0. 05$ $P < 0. 01$, Chi-square test, compared with the control

E, excitatory response; I, inhibitory response

图 1显示了非伤害和伤害刺激下各脑区神经元的典型反应, 由图中可见, 与非痛刺激相比, 痛刺激使神经元放电频率显著增加。

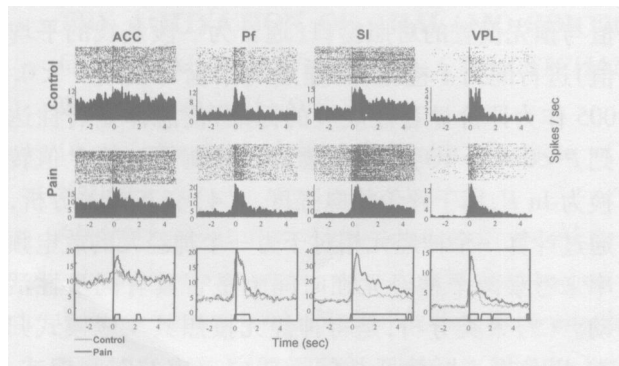


图 1 同一神经元对伤害和非伤害刺激的不同反应。最下排为滑动窗口分析的结果, 时间轴上的梯形图案指示两条曲线的显著性差异 ($P < 0. 05$)

Fig 1 The firing rate induced by pain and control stimulation in the same neuron. The bottom rows showed the result of comparison between pain and touch-induced response using sliding window method. The markers along x-axis indicated the statistically significant difference ($P < 0. 05$)

表 2 伤害性刺激和非伤害刺激下神经元的相关性活动

Table 2 Comparison of correlated neuronal activity during pain and control mechanical stimuli

	对照刺激 control	伤害性刺激 pain	神经元总的配对数 total pairs of neurons
SI和 VPL神经元的相关性 Correlated neuronal pairs between SI and VPL	38 (12. 3%)	75 (24. 4%) **	308
ACC和 P 神经元的相关性 Correlated neuronal pairs between ACC and Pf	28 (9. 2%)	65 (21. 2%) **	306

*, **: 与对照刺激引起的相关活动相比, $P < 0. 01$, Chi-square test, compared with the control

表 3 四个脑区对伤害和非伤害刺激的判别正确率

Table 3 Discriminant performance of the four brain areas

	ACC	Pf	SI	VPL
随机判别正确率 random discriminant performance	58.7%	58.6%	57.6%	58.8%
判别痛与非痛的正确率 discriminant performance involving noxious and innocuous stimuli	62.9%	64.0%*	61.5%	62.5%

* : 与随机判别正确率相比, $P < 0.05$ Chi-square test compared with random discriminant performance

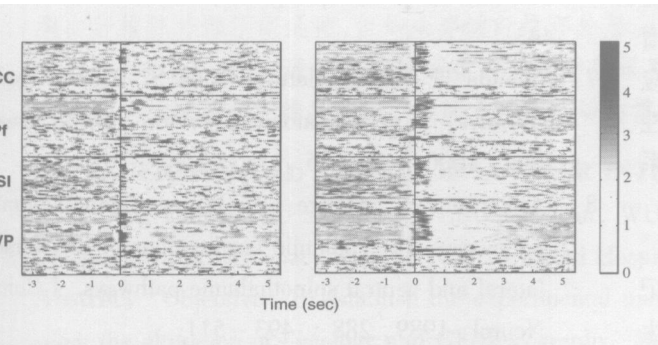


图 2 通过聚类分析将四个脑区的全部神经元按反应模式归类。灰度代表标准化后的放电频率

Fig 2 Cluster plot depicts the firing mode of all neurons in ACC, Pf, SI and VPL during mechanical stimulation. The grayscale represents the normalized firing rate

讨 论

1968年 Melzack 和 Casey 首次提出,“疼痛”这一概念包括至少两个方面的涵义,即反映伤害性刺激参数(性质、定位、强度、持续时间)的感觉辨别方面和反映厌恶情绪以及产生躲避行为的情绪动机方面,这两个方面分别经由不同的传导通路传递并由分离的脑区加工^[6],由此诞生了内、外侧痛觉系统的概念^[7],即在脑内存在两条平行上传的通路,分别传递痛的感觉和情绪信息。在本研究中将 SI和 VPL作为外侧痛觉通路的代表脑区,将 ACC和 Pf作为内侧通路的代表脑区。VPL是丘脑重要的感觉接替核,它接受内侧丘系和起源于脊髓背角 IV-V 层 STT 的纤维投射^[8]。然后将信息传送至 SI的 IV 层。由于传导速度快,神经元感受野小,SI和 VPL被公认为负责编码刺激的时间、空间和强度信息。ACC是影像学研究中最为观察到的被伤害性刺激激活的皮层部位之一,它接受的伤害性投射主要来自于丘脑的内侧核群(中线核群和板内核群)。Pf属于丘脑的板内核群,它发出纤维投射至 ACC,共同参与伤害性

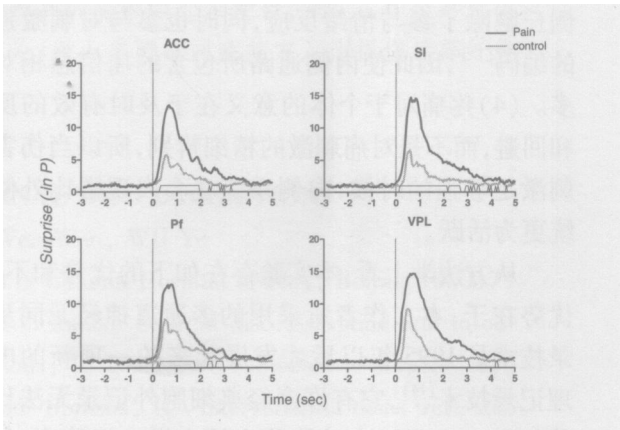


图 3 痛与非痛刺激引起的神经元反应强度的不同

Fig 3 Comparison of response magnitude of ACC, Pf, SI and VPL neurons between pain and control sessions

信息的加工和传递^[9]。

机械伤害是日常生活中最常遇到的伤害性刺激形式,包括挤压、钳捏、刺戳等,由于强度高,造成组织损伤的可能性最大。本实验的结果表明,对于同步记录的四个脑区来说,痛与非痛机械刺激均引起以兴奋为主的反应。与触觉刺激相比,疼痛刺激后各脑区神经元反应比例显著增加,平均反应强度显著增加,两条通路上脑区之间的相关活动亦显著增加。Price认为,痛觉的形成是系列发生的过程,即先有痛感觉,后产生不愉快感^[10]。但本实验发现,大脑对痛觉的这两个因素是平行加工的,即伤害性刺激同时引起内外侧通路脑区活动的增加,并无时间上的明显先后性,这与早先 Melzack 和 Casey 的观点一致^[6]。Sikes和 Vogt也指出,完全切断家兔 ACC 与体感皮层之间的纤维联系并不能改变 ACC 神经元对伤害性刺激的反应潜伏期以及兴奋性神经元的比例^[11],这表明 ACC 的激活不依赖于体感皮层的信息传入,二者是独立、平行的关系。

本实验的结果还表明,ACC 和 Pf 神经元群对痛与触觉的判别能力略高于 SI 和 VPL 换句话说,内侧

通路对痛与非痛刺激的分辨能力要稍优于外侧通路,这与本室以前采用辐射热刺激所引起的结果不同^[12]。对这一现象可做如下解释: (1)本实验自制的笔式测痛装置刺激强度较高,因此所引起的厌恶情绪反应可能比其它形式的刺激更强烈。(2)机械刺激作为一种有触觉伴随的伤害性刺激形式,同单纯触觉刺激引起的反应相比时,神经元活动中所包含的时间、空间信息可能会被抵消,只剩下强度的差别,使外侧通路的编码优势减弱。(3)ACC和内侧丘脑除了参与情绪反应,同时也参与对刺激强度的编码^[13],因此使内侧通路所包含的痛信息相对增多。(4)疼痛对于个体的意义在于及时有效的反应和回避,而不是对痛刺激的精细辨别,所以当伤害性刺激足够强的时候,内侧系统就会表现得比外侧系统更为活跃。

从方法学上看,本实验存在如下的优势和不足。优势在于,本文作者所采用的多通道神经元同步记录技术是1995年以后才发展起来的一项新的电生理记录技术^[14],它有许多经典细胞外记录无法比拟的优点: (1)通过在动物脑内植入微电极阵列,使数据采集的速度和产量都大大提高; (2)实现跨脑区同步记录多个神经元的单位电活动,便于从整体上考察复杂神经网络内部的规律性; (3)时间分辨率高; (4)在清醒动物上研究痛觉以及脑内痛相关电活动其结果较麻醉动物更为准确可靠。

本研究的不足之处在于,机械刺激测痛的方法还存在一定的局限性。实施刺激与标记刺激时间要靠手动来触发,因此会造成刺激时刻记录的偏差,不利于考察反应潜伏期。该方法还有待进一步改进。

参 考 文 献

- Bowsher D. Termination of the central pain pathway in man: the conscious appreciation of pain. *Brain* 1957, 80: 606~622
- Brooks J, Tracey I. From nociception to pain perception: imaging the spinal and supraspinal pathways. *J Anat* 2005, 207: 19~33
- Treede RD, Kenshalo DR, Gracely RH, et al. The cortical representation of pain. *Pain* 1999, 79: 105~111
- Hudson AJ. Pain perception and response: central nervous system mechanisms. *Can J Neurol Sci* 2000, 27: 2~16
- Paxinos G, Watson C. The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, San Diego, 1998
- Melzack R, Casey KL. Sensory, motivational and central control determinants of pain: a new conceptual model. In: DR Kenshalo (Eds.), *The Skin Senses*. Thomas, Springfield, IL, 1968, 423~443
- Abeida TE, Roizenblatt S, Tufek S. Afferent pain pathways: a neuroanatomical review. *Brain Res* 2004, 1000: 40~56
- Apkarian AV, Hodge CJ. Primate spinothalamic pathways. III. Thalamic terminations of the dorso-lateral and ventral spinothalamic pathways. *J Comp Neurol* 1989, 288: 493~511
- Marini G, Pianca L, Tredici G. Thalamocortical projection from the parafascicular nucleus to layer V pyramidal cells in frontal and cingulate areas of the rat. *Neurosci Lett* 1996, 203: 81~84
- Price DD. Psychological and neural mechanisms of the affective dimension of pain. *Science* 2000, 288: 1769~1772
- Skes RW, Vogt BA. Nociceptive neurons in area 24 of rabbit cingulate cortex. *J Neurophysiol* 1992, 68: 1720~1732
- Wang JY, Luo F, Chang JY, et al. Parallel pain processing in freely moving rats revealed by distributed neuron recording. *Brain Res* 2003, 992: 263~271
- Hutchison WD, Davis KD, Lozano AM, et al. Pain-related neurons in the human cingulate cortex. *Nat Neurosci* 1999, 2: 403~405
- Nicolelis MA, Ghazanfar AA, Faggin BM, et al. Reconstructing the engram: simultaneous multi-site, many single neuron recordings. *Neuron* 1997, 18: 529~537